

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 10 月 28 日 (28.10.2004)

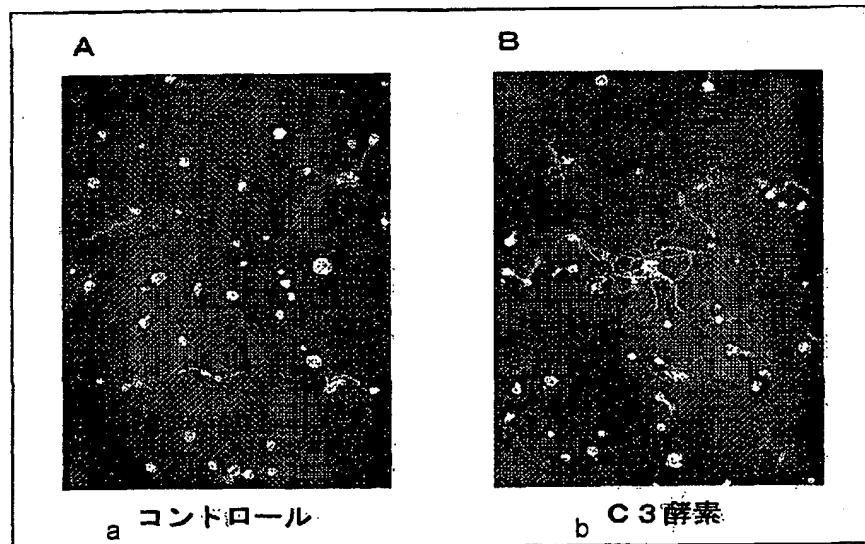
PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/091662 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 45/00, (72) 発明者; および
38/00, 31/517, A61P 27/02 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 高山 美子
(TAKAYAMA, Yoshiko) [JP/JP]; 〒6550003 兵庫県神
(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/005456 戸市垂水区小東山本町 2-21-1-902 Hyogo
(JP). 中村 義邦 (NAKAMURA, Yoshikuni) [JP/JP]; 〒
(22) 国際出願日: 2004 年 4 月 16 日 (16.04.2004) 6512116 兵庫県神戸市西区南別府 4-366-1-
106 Hyogo (JP). 井上 淳 (INOUE, Jun) [JP/JP]; 〒
(25) 国際出願の言語: 日本語 6540103 兵庫県神戸市須磨区白川台 1-26-7
Hyogo (JP). 東 光佳 (AZUMA, Mitsuyoshi) [JP/JP]; 〒
(26) 国際公開の言語: 日本語 6620031 兵庫県西宮市満池谷町 4-13-102
Hyogo (JP).
(30) 優先権データ:
特願2003-114819 2003 年 4 月 18 日 (18.04.2003) JP
特願2003-273177 2003 年 7 月 11 日 (11.07.2003) JP
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 千寿製
薬株式会社 (SENJU PHARMACEUTICAL CO., LTD.)
[JP/JP]; 〒5410046 大阪府大阪市中央区平野町 2 丁目
5 番 8 号 Osaka (JP).
(74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044
大阪府大阪市中央区伏見町四丁目 2 番 14 号 藤村
大和生命ビル Osaka (JP).
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
[続葉有]

(54) Title: AGENT FOR REPAIRING CORNEAL PERCEPTION

(54) 発明の名称: 角膜知覚回復剤

a ...CONTROL
b ...C3 ENZYME

(57) Abstract: It is intended to provide a novel drug repairing the corneal perception after a corneal surgery and improving the symptoms of dry eye. This drug, which contains an Rho protein inhibitor, is useful for treating depression in corneal perception after a cataract surgery, after an LASIK surgery, after a PRK surgery, or after corneal transplantation, or in association with neuromuscular keratopathy, corneal ulcer, diabetic keratopathy, etc. and improving dry eye symptoms.

[続葉有]

BEST AVAILABLE COPY

WO 2004/091662 A1



DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY,

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約: 本発明は、角膜手術後の角膜知覚の回復やドライアイの症状を改善する新規な医薬を提供し、この医薬は、Rh oタンパク阻害剤を含有することにより、白内障手術後、LAS I K手術後、PR K手術後、角膜移植手術後、神経麻痺性角膜症、角膜潰瘍、糖尿病性角膜症などの角膜神経変性に伴う角膜知覚低下、ドライアイ症状の改善に有用である。

1

明細書

角膜知覚回復剤

技術分野

本発明はR h oタンパク阻害剤を含有する角膜神経突起形成促進剤、および
5 角膜神経突起形成促進による角膜知覚の回復、改善、並びにドライアイの治療
剤に関する。

背景技術

レーザー屈折矯正角膜切除術(P R K)、レーザー角膜切削形成術(レーシッ
ク; L A S I K)、角膜移植などの角膜手術後には、角膜神経が切断されるため、
10 通常約3週間から1年間角膜知覚機能の低下症状が起きるといわれている。例
えば、L A S I K後には明らかに角膜神経が切断されていること(Tuuli U.
Linna et al., Experimental Eye Research 66:755-763, 1998)、また、L A S
I K後に神経像が認められないか、あるいは神経線維束が短く連結していない
角膜領域において、角膜知覚が低下することが報告されている(Tuuli U. Linna
15 et al., Investigative Ophthalmology & Visual Sciences, 41:393-397, 2000)。

P R KおよびL A S I K後における角膜知覚の低下は涙腺応答低下、涙液減
少の原因であることが示唆されている(Ang, Robert T. et al., Current Opinion
in Ophthalmology 12:318-322, 2001)。そしてこの角膜知覚機能低下のため角
膜手術後の患者では瞬目回数が減少しドライアイ症状が認められることが問題
20 となっている。一方、ドライアイ患者では、涙液機能の低下が角膜知覚の低下
をもたらし、この角膜知覚の低下がさらに涙液機能の低下を悪化させ、角膜表
面の症状を重篤化させることが問題となっている。

しかし、現在角膜手術後の角膜知覚の回復は自然回復に委ねられ、またドラ
イアイの治療においても角膜知覚を回復させるための積極的治療は施されてい
25 ないのが現状である。

また、神経麻痺性角膜症、角膜潰瘍、糖尿病性角膜症などの角膜神経変性を
伴う疾患でも角膜知覚低下が引き起こされる。

R h o タンパクは R h o ファミリー (R h o、R a c、C d c 4 2 などを含む) に包含される低分子 G タンパクであり、アクチン細胞骨格形成や、神経突起退縮反応に関係することが知られている。

例えば、R h o タンパク阻害剤である C 3 酵素は 3 T 3 線維芽細胞の細胞突起を伸展させることが知られており (Hirose, M. et al., The Journal of Cell Biology, 141:1625-1636, 1998)、R h o タンパク阻害剤の有効量を患者に投与することによって中枢神経軸索成長を促進する方法が開示されている (特表 2 0 0 1 - 5 1 5 0 1 8 号公報、欧州特許出願公開第 1, 0 1 1, 3 3 0 号明細書)。また、R h o タンパクのエフェクター分子の一つである R h o キナーゼの阻害剤が網膜神経節細胞の軸索伸展作用を有し、視神経細胞の再生促進作用を有することが知られている (国際公開第 0 2 / 8 3 1 7 5 号パンフレット、欧州特許出願公開第 1, 1 4 2, 5 8 5 号明細書)。国際公開第 0 3 / 0 2 0 2 8 1 号パンフレットでは、L A S I K などの手術後の角膜神経傷害に起因する病態を治療する目的に神経再生または神経突起伸展を促進する化合物が使えるとされており、それら化合物の例として神経栄養因子刺激物質であるネオトロフィンなどの化合物が例示されているが、R h o タンパク阻害剤の記載はなく、またそれらを示唆する記載もない。

三叉神経に対しては、ラット三叉神経組織培養 (trigeminal tract in whole mount cultures) 系において、神経成長因子 (N G F) などの神経栄養因子誘発神経軸索伸展が R h o 活性化剤 (リゾホスファチジン酸) で阻害され、ドミナントネガティブ R h o を細胞に導入することで促進されることが報告されている (Ozdinler, P. Hande et al., The Journal of Comparative Neurology, 438:377-387, 2001)。その一方、神経栄養因子非存在下では、R h o が三叉神経軸索伸展に有効かどうかについては分からないとの記載があり、R h o タンパク阻害剤の三叉神経に対する効果についても未だ判明していない。

一方、R h o 活性化作用を有する化合物が角膜上皮伸展作用を有し、R h o タンパク阻害剤である C 3 酵素によってその角膜上皮の伸展が抑制されること

から、R h o 活性化作用を有する化合物が、角膜潰瘍、角膜上皮剥離、角膜炎などの角膜障害に有用であることが開示されている(特開 2 0 0 0 - 2 6 4 8 4 7 号公報、欧州特許出願公開第 1, 1 4 2, 5 8 5 号明細書)。

発明の開示

- 5 レーザー屈折矯正角膜切除術(P R K)、レーザー角膜切削形成術(レーシック; L A S I K)、角膜移植などの角膜手術後などの角膜知覚機能低下や、ドライアイ患者における角膜知覚低下を回復させる医薬を提供することである。

本発明者らは、角膜術後の角膜知覚回復やドライアイにおける角膜知覚症状を改善する新しいタイプの医薬を提供することを目的に検討を行ったところ、

- 10 R h o タンパク阻害剤が三叉神経(以後、角膜神経ということもある。)細胞の神経突起形成促進効果を有することを初めて見出し、これらの知見に基づいてさらに研究をすすめ、R h o タンパク阻害剤を角膜知覚回復などの医薬として利用する本発明を完成した。

すなわち、本発明は、

- 15 (1) R h o タンパク阻害剤を含有する角膜神経突起形成促進剤;
(2) R h o タンパク阻害剤を含有する角膜神経軸索伸展促進剤;
(3) R h o タンパク阻害剤を含有する角膜知覚回復剤;
(4) R h o タンパク阻害剤を含有するドライアイ治療剤;
(5) R h o タンパク阻害剤を含有する角膜神経突起形成促進用組成物;
20 (6) R h o タンパク阻害剤を含有する角膜神経軸索伸展促進用組成物;
(7) R h o タンパク阻害剤を含有する角膜知覚回復用組成物;
(8) R h o タンパク阻害剤を含有するドライアイ治療用組成物;
(9) 角膜神経突起形成促進用組成物を製造するための R h o タンパク阻害剤の使用;
25 (10) 角膜神経軸索伸展促進用組成物を製造するための R h o タンパク阻害剤の使用;
(11) 角膜知覚回復用組成物を製造するための R h o タンパク阻害剤の使用;

- (12) ドライアイ治療用組成物を製造するための R h o タンパク阻害剤の使用；
- (13) 角膜神経の神経突起形成促進が必要とされる対象に R h o タンパク阻害剤の有効量を投与することによる角膜神経の神経突起形成を促進する方法；
- (14) 角膜神経の軸索伸展促進が必要とされる対象に R h o タンパク阻害剤の有効量を投与することによる角膜神経の軸索伸展を促進する方法；
- 5 (15) 角膜知覚の回復が必要とされる対象に R h o タンパク阻害剤の有効量を投与することによる角膜知覚を回復する方法；
- (16) ドライアイに罹患した対象に R h o タンパク阻害剤の有効量を投与することによるドライアイを治療する方法
- 10 に関するものである。

図面の簡単な説明

- 図 1 は試験例 1 におけるウサギ培養三叉神経細胞の蛍光顕微鏡像を示す。A は C 3 酵素無添加培養液で 2 4 時間培養したウサギ三叉神経細胞を、B は C 3 酵素を最終濃度 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ になるよう添加した培養液で 2 4 時間培養した細胞を示す。
- 15

図 2 は試験例 1 における神経突起形成細胞の全細胞数に対する比率 (%) を示す。縦軸は全細胞に対する神経突起形成細胞の割合を示す。各値は 3 例の平均値 \pm 標準誤差を示す。図中 * はコントロールに対する有意差 ($p < 0.05$) を示す。

- 20 図 3 は試験例 2 における培養ウサギ三叉神経細胞の蛍光顕微鏡像を示す。A は被験物質無添加培養液、B は化合物 1 添加 (最終濃度 $10 \mu\text{M}$) 培養液、C は化合物 2 添加 (最終濃度 $10 \mu\text{M}$) 培養液、D は化合物 3 添加 (最終濃度 $1 \mu\text{M}$) 培養液、E は化合物 4 添加 (最終濃度 $10 \mu\text{M}$) 培養液で 4 8 時間培養した細胞を示す。

- 25 図 4 は試験例 2 におけるカウントした全細胞数に対する神経突起形成細胞の比率 (%) を示すグラフである。各値は 3 例の平均値 \pm 標準誤差を示す。図中 * は無添加群に対する有意差 $p < 0.05$ を、** は無添加群に対する有意差

$p < 0.01$ を示す。

図5は試験例3において、ウサギ角膜(C)と三叉神経節(T)におけるROCK IおよびROCK IIウェスタンブロッティングの結果を示す。

発明の詳細な説明

- 5 本明細書中において、「Rhoタンパク阻害剤」とは、不活性型のGDP結合型Rhoタンパク質が活性型のGTP結合型Rhoタンパク質へと活性化されるのを阻害する全ての阻害剤、およびRhoタンパクまたはRhoタンパクフラグメントに対する抗体など、並びにRhoタンパクの作用を伝達するエフェクター分子、例えばRhoキナーゼ(ROCK)の働きを阻害するすべての阻
- 10 害剤などをも包含するものである。「角膜神経」とは、知覚神経である三叉神経の支配を受け角膜周囲に形成される輪状神経叢、角膜実質に網目上に分布する実質内神経叢、ボーマン膜直下で形成される上皮神経叢、ボーマン膜を貫通したところで形成される基底細胞神経叢および神経線維をいう。本発明における「神経突起」とは、ニューロン(神経細胞)の細胞体から出る突起(樹状突
- 15 起および軸索)をいい、「形成」とは細胞体から前記神経突起が生成または／および伸展することをいう。どの程度の神経突起形成をもって促進されている状態というかは、当業者には明らかである。神経突起形成の促進は、例えば、神経細胞を蛍光染色し、蛍光顕微鏡を用いて細胞の状態を観察することにより確認することができる。また、蛍光顕微鏡での観察結果を画像解析ソフトなどを
- 20 用いて解析してもよい。さらに、その結果を統計学的処理することにより神経突起形成の状態を数値化することも可能である。さらに別の方法として、神経細胞体および神経突起を構成するもの、例えばニューロフィラメントを認識する抗体、およびこれと反応する西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)結合抗体で標識した後、HRPを発色させて吸光度を測定することによりニューロ
- 25 フィラメント量を測定し、神経突起形成の指標とすることもできる。

Rhoタンパク阻害剤としては、例えばC3細胞外酵素(Exoenzyme C3、本明細書においては単にC3酵素ということもある。)、トキシンA(Toxin

A) およびトキシンB (Toxin B) 並びにRhoキナーゼ阻害剤が挙げられる。

このうち、Rhoキナーゼ阻害剤(以後、ROCK阻害剤ということもある。)としては、例えば、特開昭61-227581号公報(米国特許第4,678, 783号明細書)に記載の化合物、例えば、塩酸ファスジルなどで代表されるイソキノリンスルホニル誘導体; 国際公開第00/57914号パンフレットおよび特開2000-44513号公報に記載の化合物、例えば、エタクリン酸および4-[2-(2,3,4,5,6-ペンタフルオロフェニル)アクリロイル]桂皮酸などのRhoキナーゼ阻害剤; 国際公開第02/076977号パンフレット(欧州特許公開第1,370,552号明細書、同第1,370,553号明細書)に記載の化合物、例えば、2-クロロ-6,7-ジメトキシ-N-[5-1H-インダゾリル]キナゾリン-4-アミンなどのRhoキナーゼ阻害剤; および国際公開第02/100833号パンフレットに記載の化合物、例えば、N-(1-ベンジル-4-ピペリジニル)-1H-インダゾール-5-アミン・2塩酸塩・1水和物などのRhoキナーゼ阻害剤が挙げられる。

なお、以下の説明において、本発明で用いるRhoタンパク阻害剤を含有する薬剤および組成物をまとめて、「本発明の医薬」ということもある。

本発明の医薬は、哺乳動物(例えばヒト、ラット、マウス、ウサギ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコなど)における角膜神経が障害、切断または欠損した、例えばPRKやLASIK後の低下した角膜知覚回復のための治療薬として、あるいは神経麻痺性角膜症、角膜潰瘍、糖尿病性角膜症などの角膜神経変性に伴う角膜知覚低下や角膜知覚の低下したドライアイの治療薬として有用である。

本発明の医薬は全身的または局所的に投与される。全身的には、経口投与に加え、静脈内注射、皮下注射、筋肉内注射など非経口的にも投与される。局所的には、眼に投与される。

本発明の医薬の製剤形態としては、粉末、顆粒、錠剤、カプセル剤、坐剤な

どの固形剤、およびシロップ剤、注射剤、点眼剤などの液剤などが挙げられる。

本発明の医薬を顆粒および錠剤として製造する場合には、例えば賦形剤（乳糖、白糖、ブドウ糖、デンプン、結晶セルロースなど）、滑沢剤（ステアリン酸マグネシウム、タルク、ステアリン酸、ステアリン酸カルシウムなど）、崩壊剤
5 （デンプン、カルメロースナトリウム、炭酸カルシウムなど）、結合剤（デンプン糊液、ヒドロキシプロピルセルロース液、カルメロース液、アラビアゴム液、ゼラチン液、アルギン酸ナトリウム液など）などを用いることにより任意の剤形を製造することができる。また、顆粒剤および錠剤には、適当なコーティング剤（ゼラチン、白糖、アラビアゴム、カルナバロウなど）、腸溶性コーティ
10 グ剤（例えば酢酸フタル酸セルロース、メタアクリル酸コポリマー、ヒドロキシプロピルセルロースフタレート、カルボキシメチルエチルセルロースなど）などで剤皮を施してもよい。

本発明の医薬をカプセル剤として製造する場合には、適当な賦形剤、例えば流動性と滑沢性を向上させるためのステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸
15 カルシウム、タルク、軽質無水ケイ酸など、また加圧流動性のための結晶セルロースや乳糖などの他、上記崩壊剤などを適宜添加したものを均等に混和または粒状もしくは粒状としたものに適当なコーティング剤で剤皮を施したものを充填するか、適当なカプセル基剤（ゼラチンなど）にグリセリンまたはソルビトールなどを加えて塑性を増したカプセル基剤で被包成形することもできる。
20 これらカプセル剤には必要に応じて、着色剤、保存剤〔二酸化イオウ、パラベン類（パラオキシ安息香酸メチル、エチル、プロピルエステル）〕などを加えることができる。カプセル剤は通常のカプセルの他、腸溶性コーティングカプセル、胃内抵抗性カプセル、放出制御カプセルとすることもできる。腸溶性カプセルとする場合、腸溶性コーティング剤でコーティングした化合物、または化
25 合物に上記の適当な賦形剤を添加したものを、通常のカプセルに充填または、カプセル自身を腸溶性コーティング剤でコーティング、もしくは腸溶性高分子を基剤として成形することができる。

本発明の医薬を坐剤として製造する場合には、坐剤基剤（例えばカカオ脂、マクロゴールなど）を適宜選択して使用することができる。

本発明の医薬をシロップ剤として製造する場合、例えば安定剤（エデト酸ナトリウムなど）、懸濁化剤（アラビアゴム、カルメロースなど）、矯味剤（単シ
5 ロップ、ブドウ糖など）、芳香剤などを適宜選択して使用することができる。

本発明の医薬を注射剤または点眼剤として製造する場合、医薬上許容される添加物、例えば等張化剤（塩化ナトリウム、塩化カリウム、グリセリン、マンニトール、ソルビトール、ホウ酸、ホウ砂、ブドウ糖、プロピレングリコールなど）、緩衝剤（リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、炭酸緩衝液、クエ
10 ン酸緩衝液、トリス緩衝液、グルタミン酸緩衝液、イブシロンアミノカプロン酸緩衝液など）、保存剤（パラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、塩化ベンザルコニウム、デヒドロ酢酸ナトリウム、エデト酸ナトリウム、ホウ酸、ホウ砂など）、増粘剤（ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコー
15 ルなど）、安定化剤（亜硫酸水素ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、エデト酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、アスコルビン酸、ジブチルヒドロキシトルエンなど）、pH調整剤（塩酸、水酸化ナトリウム、リン酸、酢酸など）などを適宜添加した溶液に溶解または分散することによって製造することができる。

上記シロップ剤、注射剤および点眼剤における添加剤の添加量は、添加する
20 添加剤の種類、用途などによって異なるが、添加剤の目的を達成し得る濃度を添加すればよく、等張化剤は、通常、浸透圧が約229～約343mOsmとなるよう、約0.5～約5.0w/v%を添加する。また、緩衝剤は約0.01～約2.0w/v%程度、増粘剤は約0.01～約1.0w/v%程度、安定化剤は約0.001～約1.0w/v%程度になるように添加する。pH調
25 整剤は、適宜添加し、通常pH約3～約9、好ましくは約4～約8になるように添加する。

特に本発明の医薬を点眼剤として使用する場合、本発明の医薬に含まれるR

h o タンパク阻害剤の濃度は、通常下限は約 0. 0 0 0 0 1 w / v %、好ましくは約 0. 0 0 0 0 5 w / v %、より好ましくは約 0. 0 0 0 1 w / v %であり、上限は約 0. 1 w / v %、好ましくは約 0. 0 5 w / v %、より好ましくは約 0. 0 1 w / v %、さらに好ましくは約 0. 0 0 5 w / v %、なおさらに
5 好ましくは約 0. 0 0 1 w / v %に調製される。

本発明の医薬の投与量は対象となる疾患、症状、投与対象、R h o タンパク阻害剤の種類、投与方法などにより異なるが、例えば P R K 手術後の角膜知覚回復剤として成人の眼に局所的に使用する場合には、例えば C 3 酵素約 0. 0 0 1 w / v %含有する点眼液を、あるいは、N - (1 - ベンジル - 4 - ピペリ
10 ジニル) - 1 H - インダゾール - 5 - アミン・2 塩酸塩・1 / 2 水和物などの R h o タンパク阻害剤を約 0. 0 0 3 w / v %含有する点眼液を、1 回約 2 0 ~ 約 5 0 μ L、1 日数回点眼するのがよい。

また、本発明の医薬を L A S I K 手術後の角膜知覚回復剤として成人に経口投与する場合、例えば、4 - [2 - (2, 3, 4, 5, 6 - ペンタフルオロフェ
15 ニル) アクリロイル] 桂皮酸などの R h o タンパク阻害剤を約 1 0 m g 含有する錠剤を 1 日 1 回ないし 2 回服用するのがよい。

実施例

本発明を以下の試験例及び実施例に従いさらに詳細に説明するが、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

20 試験例 1 培養ウサギ三叉神経細胞の神経突起形成促進作用

1) 使用動物

福岡養兔組合より購入した日本白色種ウサギ（生後 2 ~ 3 日）を使用した。

2) 被験物質

C 3 酵素 [upstate 社製 ; Exoenzyme C3 (recombinant enzyme expressed in
25 E. coli) ; Catalog #13-118, Lot #23330]

3) 試験方法

細胞培養 : 三叉神経細胞の単離は Chan らの報告 (Chan, Kwan Y. and Haschke,

Richard H., Exp. Eye Res., 41: 687-699, 1985) を参考にして行った。すな
わち、ウサギをエーテル麻酔下、生理食塩水で心臓を灌流後、三叉神経節を切
り出し、神経分散液（住友ベークライト社製）を用いて、三叉神経節を分散さ
せた後、ポリリジンでコートした 8 ウェルカルチャースライド（BECTON
5 DICKINSON 社製）に細胞を播種した。細胞数は 1 ウェルあたり約 3×10^3 細胞
とし、培養条件は 5% CO_2 、95% 空気下、湿度 100%、37℃とした。
細胞培養にはニューロベーサル培養液（GIBCO 社製）に B27 Supplement（GIBCO
社製；0.02 mL/mL 培養液）および L-グルタミン酸（GIBCO 社製；最
終濃度 1 mM）を添加した培養液を用い、細胞播種直後に C3 酵素（2 $\mu\text{g}/$
10 mL 最終濃度）を添加して 24 時間培養した。

免疫染色：培養 24 時間後に、細胞を 4% パラホルムアルデヒドを用いて室
温で 2 時間固定し、神経細胞に特異的な中間径フィラメントであるニューロ
フィラメントを特異的に認識する抗ニューロフィラメント 200 抗体（Sigma
社製）およびこれと反応する蛍光二次抗体（Molecular Probes 社製）を用いて
15 神経細胞体および神経突起を蛍光染色した。染色細胞は蛍光顕微鏡からコン
ピュータに画像（1 画像：1.83 mm × 1.36 mm）として取り込み、画
像中の全細胞数（ t ）をカウントすると共に、画像解析ソフト（MacSCOPE, MITANI
CO. 社製）を用いて細胞の神経突起の長さを測定し、細胞体の直径の 2 倍以上長
さの神経突起を持つ細胞を神経突起形成細胞（ a ）としてカウントした。各画
20 像中の全細胞数の合計（ $t_1 + t_2 + \dots + t_n = \Sigma t$ ）が約 100 以上となるま
で複数の画像を取り込んだ。その時の総神経突起形成細胞数（ $a_1 + a_2 + \dots +$
 $a_n = \Sigma a$ ）の全細胞数合計（ Σt ）に対する比率（%）を計算した。この比
率について、C3 酵素添加群と無添加群（コントロール群）とを比較するため
に、 t -test により検定して危険率 5% 未満を有意であると判定した。

25 4) 試験結果

図 1 は培養ウサギ三叉神経細胞の蛍光顕微鏡像を示している。図 1 中、A は
C3 酵素無添加培養液で 24 時間培養したコントロール群の細胞を、B は C3

酵素を最終濃度 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 添加した培養液で 24 時間培養した細胞を、図 2 は各群の全細胞数に対する神経突起形成細胞数の比率を示す。

神経突起形成細胞の比率はコントロール群では全細胞の約 21%、C3 酵素添加群では全細胞の約 46% であり、C3 酵素添加により突起形成細胞数の有意な増加が認められた (図 2)。

以上のことから、Rho 阻害活性を有する C3 酵素は三叉神経細胞の突起形成を促進することが分かった。

試験例 2 培養ウサギ三叉神経の突起形成促進作用

1) 使用動物

10 北山ラベス社より購入した日本白色種ウサギ (生後 2~3 日) を使用した。

2) 被験物質

ROCK 阻害剤として、2-クロロ-6, 7-ジメトキシ-N-[5-1H-インダゾリル] キナゾリン-4-アミン、N-(1-ベンジル-4-ピペリジニル)-1H-インダゾール-5-アミン・2 塩酸塩、4-[2-(2, 3, 4, 5, 6-ペンタフルオロフェニル) アクリロイル] 桂皮酸および塩酸ファスジルを使用した。

2-クロロ-6, 7-ジメトキシ-N-[5-1H-インダゾリル] キナゾリン-4-アミン (以下、化合物 1 と記載する。) は参考例 1 に従い合成したものをを使用した。N-(1-ベンジル-4-ピペリジニル)-1H-インダゾール-5-アミン・2 塩酸塩・1/2 水和物 (以下、化合物 2 と記載する。) は参考例 2 に従い合成したものをを使用した。4-[2-(2, 3, 4, 5, 6-ペンタフルオロフェニル) アクリロイル] 桂皮酸 (以下、化合物 3 と記載する。) は参考例 3 に従い合成したものをを使用した。塩酸ファスジル (以下、化合物 4 と記載する。) は市販の塩酸ファスジル水和物注射液「エリル注 30mg」(旭化成株式会社製) を使用した。

3) 細胞培養

ウサギ三叉神経細胞の単離は試験例 1 と同様に行った。細胞培養にはニュー

ロベールサル培養液 (GIBCO 社製) に B27 Supplement (GIBCO 社製; 最終濃度 2 % v/v) および L-グルタミン (GIBCO 社製; 最終濃度 1 mM) を添加した培養液を用い、24 ウェルプレート (各ウェルにポリリジン/ラミニンコーティング済み円形カバーガラス (直径 12 mm; 住友ベークライト社製) を入れ、

5 そのカバーガラス上に約 3×10^3 細胞/ウェルとなるように細胞を播種した。細胞がカバーガラスに接着後 (約 2 時間)、上記培養液をそれぞれの被験物質添加培養液 (化合物 1, 最終濃度 $10 \mu\text{M}$; 化合物 2, 最終濃度 $10 \mu\text{M}$; 化合物 3, 最終濃度 $1 \mu\text{M}$; 化合物 4, 最終濃度 $10 \mu\text{M}$) に交換し、48 時間培養した。培養条件は、5 % CO_2 、95 % 空気下、湿度 100 %、温度 37 °C

10 で行った。

4) 免疫染色

培養 48 時間後の細胞を 4 % パラホルムアルデヒドを用いて室温で 2 時間固定した。

神経細胞に特異的な中間径フィラメントであるニューロフィラメントを認識

15 する抗ニューロフィラメント 200 抗体 (Sigma 社製) およびこれと反応する蛍光二次抗体 (Molecular Probes 社製) を用いて固定した標本を蛍光染色し、蛍光顕微鏡を用いて染色された細胞を検出した。染色像は、コンピュータに画像 1 画像: $1.83 \text{ mm} \times 1.36 \text{ mm}$ として取り込んだ。画像中の全細胞数 (t) をカウントすると共に、画像解析ソフト (MacSCOPE, MITANI CO.) を用

20 いて細胞の神経突起長および細胞体直径を測定し、細胞体直径の 2 倍以上長さの神経突起を有する細胞を神経突起形成細胞 (a) としてカウントした。各画像中の全細胞数の合計 ($t_1 + t_2 + \dots + t_n = \Sigma t$) が約 100 以上となるまで画像を取り込んだ。その時の総神経突起形成細胞数 ($a_1 + a_2 + \dots + a_n = \Sigma a$) の全細胞数 (Σt) に対する比率 (%) を計算した。

25 5) 統計学的処理

神経突起形成細胞比率について、無添加群 (コントロール) と被験物質添加群との比較を Dunnett's 多重比較検定法により行ない、危険率 5 % 未満を有意

であると判定した。

6) 試験結果

図3に培養ウサギ三叉神経細胞の蛍光顕微鏡像を示す。

図3Aは、被験物質無添加培養液で48時間培養した細胞を、図3Bは化合物1を添加した培養液で48時間培養した細胞を、図3Cは化合物2を添加した培養液で48時間培養した細胞を、図3Dは化合物3を添加した培養液で48時間培養した細胞を、図3Eは化合物4を添加した培養液で48時間培養した細胞を示している。

図4は、全細胞数に対する無添加群およびそれぞれ被験物質添加群の神経突起形成細胞数の比率を示している。全細胞に対する神経突起形成細胞の比率は、無添加群で約31%、化合物1添加群で約41%、化合物2添加群で約57%、化合物3添加群で約51%、化合物4添加群で約70%であり、被験物質添加群では神経突起形成細胞比率の有意な増加あるいは増加傾向が認められた。

以上の結果からROCK阻害剤は、三叉神経細胞の神経突起形成を促進する作用を有することが明らかとなった。

参考例1 2-クロロ-6,7-ジメトキシ-N-[5-1H-インダゾリル]キナゾリン-4-アミンの合成 (国際公開第02/076977号パンフレット、実施例1)

2,4-ジクロロ-6,7-ジメトキシキナゾリン (8.6 g, 64.58 mmol)、5-アミノインダゾール (4.8 g, 36.04 mmol) および酢酸カリウム (7.351 g, 74.91 mmol) をテトラヒドロフラン/精製水 (138 mL/62 mL) 中に加え、一晚室温下で攪拌した。混合物に精製水 (130 mL) を加え、結晶を析出させた。析出した結晶は精製水で洗浄し、DMF-水から再結晶し目的とする2-クロロ-6,7-ジメトキシ-N-[5-1H-インダゾリル]キナゾリン-4-アミンの微黄色粉末を得た。
mp 278.7-283.8 °C. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 3.93 (s, 3H), 3.96 (s, 3H), 7.16 (s, 1H), 7.60 (m, 2H), 7.90 (s, 1H), 8.03 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 9.94

(s, 1H), 13.13 (br s, 1H). Anal. Calcd. for $C_{17}H_{15}N_5O_2Cl \cdot 1/2H_2O$: C, 55.97, H, 4.14, N, 19.20. Found: C, 56.05, H, 4.46, N, 19.22.

参考例2 N-(1-ベンジル-4-ピペリジニル)-1H-インダゾール-5-アミン・2塩酸塩・1/2水和物の合成 (国際公開第02/100833号パンフレット、実施例1)

1-ベンジル-4-ピペリドン (14.21 g, 75.1 mmol, 13.92 mL) の1, 2-ジクロロエタン (80 mL) 溶液中に、室温にて5-アミノインダゾール (10.0 g, 75.10 mmol)、トリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム (11.5 g, 52.6 mmol)、酢酸 (4.29 mL, 75.1 mmol) を加え、室温にて終夜攪拌した。次に、反応液を1N-水酸化ナトリウム水溶液に注ぎ、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄してから、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を減圧留去して得られた残渣をメタノールから再結晶することにより、N-(1-ベンジル-4-ピペリジニル)-1H-インダゾール-5-アミン (7.8 g, 34%) を得た。

mp 150.1-152.2 °C. 1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 1.39 (m, 2H), 1.94 (m, 2H), 2.08 (t, 2H, J = 10.8), 2.79 (d, 2H, J = 11.4), 3.19 (m, 1H), 3.47 (s, 3H), 5.11 (d, 1H, J = 7.8), 6.68 (br s, 1H), 6.83 (dd, 1H, J = 8.9, 1.7), 7.20-7.37 (m, 6H), 12.58 (br s, 1H). Anal. Calcd. for $C_{19}H_{22}N_4$: C, 74.48, H, 7.24, N, 18.29. Found: C, 74.42, H, 7.27, N, 18.37

得られたN-(1-ベンジル-4-ピペリジニル)-1H-インダゾール-5-アミン (6.0 g, 19.58 mmol) のテトラヒドロフラン (60 mL) 溶液中に、室温にて1N-塩酸/エーテル溶液 (38 mL) および4N-塩酸/酢酸エチル溶液 (13 mL) を加え、室温にて30分間攪拌した。析出した固体を濾取し、メタノールから再結晶することにより、N-(1-ベンジル-4-ピペリジニル)-1H-インダゾール-5-アミン・2塩酸塩・1/2水和物 (4.32 g, 56%) を得た。

mp 193.0-194.6 °C. 1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 2.18 (m, 1.75H), 2.51 (m,

0.25H), 2.98 (m, 1.5H), 3.17 (m, 0.5H), 3.41 (m, 2H), 3.68 (m, 0.75H), 3.90 (m, 0.25H), 4.25 (m, 1.5H), 4.46 (m, 0.5H), 7.40-7.64 (m, 6H), 7.59 (m, 1H), 7.70 (m, 1H), 7.92 (m, 1H), 8.20 (s, 1H), 11.02 (br s, 0.75H), 11.53 (br s, 0.25H). Anal. Calcd. for $C_{19}H_{22}N_4 \cdot 2HCl \cdot 1/2H_2O$: C, 58.76, H, 6.49, N, 14.43. Found: C, 58.49, H, 6.48, N, 14.45.

参考例3 4-[2-(2, 3, 4, 5, 6-ペンタフルオロフェニル)アクリロイル]桂皮酸の合成 (特開2000-44513号公報、実施例8)

工程1

窒素雰囲気下、ドライアイスで冷却しながら、イソブテン(27 mL)に(2, 3, 4, 5, 6-ペンタフルオロフェニル)酢酸(20 g, 93.5 mmol)、エーテル(7 mL)および濃硫酸(0.5 mL)を加え、耐圧管中、室温で3日間攪拌した。10%炭酸水素ナトリウム水溶液と氷との混合物に、ドライアイスで冷却した反応液を加え攪拌した。エーテルを加えて抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧濃縮し、(2, 3, 4, 5, 6-ペンタフルオロフェニル)酢酸 t-ブチルエステル(24.4 g, 97%)を得た。

工程2

4-ホルミル安息香酸(20 g, 0.133 mmol)のピリジン(138 mL)溶液にマロン酸エチルモノカリウム塩(46 g, 0.270 mmol)、p-トルエンスルホン酸・1水和物(50 g, 0.263 mmol)およびピペリジン(2.0 mL)を加え、混合液を徐々に加熱したのち120℃で1.5時間攪拌した。氷冷下、反応液に2N塩酸を加えて酸性とし、析出物を濾取することにより4-カルボキシ桂皮酸 エチルエステル(26.58 g, 91%)を結晶として得た。

25 工程3

窒素雰囲気下、4-カルボキシ桂皮酸 エチルエステル(5.0 g, 22.7 mmol)のクロロホルム(15 mL)溶液に塩化チオニル(8.4 mL)

を滴下したのち、ジメチルホルムアミド(1滴)を加え30分間加熱還流した。反応液を減圧濃縮し酸クロライドを得た。

- 窒素雰囲気下、工程1で得た(2, 3, 4, 5, 6-ペンタフルオロフェニル)酢酸 t-ブチルエステル(6.35 g, 23.5 mmol)のテトラヒドロフラン(100 mL)溶液に、ドライアイスで冷却しながらリチウムビス(トリメチルシリル)アミドの1Mトルエン溶液(26 mL)を滴下した。5分後、さらに工程2で得た酸クロライドのテトラヒドロフラン(100 mL)溶液を滴下した。滴下終了20分後に、室温で1.5時間攪拌した。反応液に5%クエン酸水溶液(120 mL)を加え、エーテルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後減圧濃縮した。得られる残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、4-[(2RS)-2-(t-ブトキシカルボニル)-2-(2, 3, 4, 5, 6-ペンタフルオロフェニル)アセチル]桂皮酸 エチルエステル(4.83 g, 44%)を結晶として得た。

15 工程4

- 工程3で得た4-[(2RS)-2-(t-ブトキシカルボニル)-2-(2, 3, 4, 5, 6-ペンタフルオロフェニル)アセチル]桂皮酸 エチルエステル(5.6 g, 11.6 mmol)のジオキサン(24 mL)溶液を耐圧管に入れ、濃塩酸(24 mL)を加えた。130℃に加熱しながら4時間攪拌した。
- 20 反応液を氷冷して析出物を濾取し、4-[(2, 3, 4, 5, 6-ペンタフルオロフェニル)アセチル]桂皮酸(3.7 g, 90%)を結晶として得た。この4-[(2, 3, 4, 5, 6-ペンタフルオロフェニル)アセチル]桂皮酸(2.03 g, 5.7 mmol)のジオキサン(115 mL)溶液を耐圧管に入れ、パラホルムアルデヒド(0.7 g)、ジメチルアミン塩酸塩(1.86 g, 22.8 mmol)、酢酸(10滴)および無水硫酸マグネシウム(8 g)を加えて130℃に加熱しながら一晩攪拌した。氷冷下、反応液に0.1N塩酸を加えて酸性とし酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネ

シウムで乾燥後減圧濃縮した。析出物を濾取し、標記化合物 1.46 g (93%) を結晶として得た。

mp 214.0–217.0°C. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 6.25 (s, 1H), 6.30 (s, 1H), 6.46 (d, 1H, J = 16.2), 7.57 (d, 2H, J = 8.4), 7.64 (d, 1H, J = 15.9), 7.78
5 (d, 2H, J = 8.4)

試験例 3 ウサギ三叉神経節および角膜組織における ROCK I, ROCK II のタンパク質発現

1) 使用動物

日本白色種雄性ウサギを北山ラベス社より購入して実験に使用した。

10 2) 組織可溶性タンパク質の調製

動物を安楽死させた後、三叉神経節および角膜を摘出した。摘出した組織は氷冷したリン酸緩衝生理食塩水 (Invitrogen 社製) 中に移して洗浄し、氷冷した 0.1% の Triton X-100 (Pharmacia Biotech 社製) および 1
t a b l e t / 1 0 m l の P r o t e a s e i n h i b i t o r c o c
15 k t a i l (complete, Mini; Roche 社製) を含む 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) 中に移して超音波破碎をおこなった。超音波破碎処理により得られた各組織由来の細胞粗破碎液を遠心分離 (10,000 × g, 15 分, 4°C) し、上清を回収して組織可溶性タンパク質溶液を得た。溶液中のタンパク質量は BCA プロテインアッセイリジェント (PIERCE 社製) を用いて定量した。

20 3) ウェスタンブロッティング法を用いた ROCK I, ROCK II の検出

調製した組織可溶性タンパク質に含まれる ROCK I, ROCK II をウェスタンブロッティング法を用いて検出した。25 μg のタンパク質を含む調製溶液を 8% の SDS ポリアクリルアミドゲル (TEFCO 社製) を用いて電気泳動法により分離し、ゲル内に分離されたタンパク質を P V D F 膜
25 (Immobilon-P; Millipore) 上に電氣的に転写した。タンパク質の転写された膜を 5% のスキムミルクでブロッキングした後、ヤギ抗 ROCK I 抗体あるいはヤギ抗 ROCK II 抗体 (ともに SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY 社製) と反応

させ、アルカリフォスファターゼ (AP) 結合抗ヤギ IgG 抗体 (バイオラッド社製) を用いて二次標識した。抗原の免疫検出は AP 発色キット (バイオラッド社製) を用いておこなった。

4) 試験結果

- 5 図 5 にウェスタンブロッティングの結果を示した。ROCK I および ROCK II とともにウサギ三叉神経節および角膜組織の可溶性タンパク質中にタンパク質レベルで発現していることが確認できた。

実施例 1 錠剤

	C 3 酵素	10 mg
10	乳糖	80 mg
	デンプン	17 mg
	ステアリン酸マグネシウム	3 mg
	結晶セルロース	10 mg

- 15 以上の成分を 1 錠分の材料として、常法により錠剤を成形する。錠剤は必要に応じて通常用いられる腸溶性コーティング剤 (例えばフタル酸ヒドロキシプロピルメチルセルロースなど)、糖衣およびフィルム (例えばエチルセルロース) を適用してもよい。主薬成分である C 3 酵素を、化合物 1、2、3 又は 4 に変えてもよい。また添加剤との配合比を変えることにより、主薬の成分量が 20 mg、5 mg、1 mg、0.5 mg、0.1 mg/錠の錠剤を調製しうる。

20 実施例 2 カプセル剤

	C 3 酵素	50 mg
	マンニトール	75 mg
	デンプン	17 mg
	ステアリン酸カルシウム	3 mg

- 25 以上の成分を 1 カプセル分の材料として均一に混合し、常法により顆粒状とし、硬カプセルに充填する。充填前に必要に応じて、通常用いられる腸溶性コーティング剤 (例えばフタル酸ヒドロキシプロピルメチルセルロース)、糖衣また

はフィルム（例えばエチルセルロース）を顆粒に適用してもよい。主薬成分であるC3酵素を、化合物1、2、3又は4に変えてもよい。また添加剤との配合比を変えることにより、主薬の成分量が20mg、10mg、5mg、1mg、0.5mg、0.1mg／カプセルのカプセル剤を調製しうる。

5 実施例3 注射剤

C3酵素	750 mg
カルボキシメチルセルロースナトリウム	500 mg
注射用水	全量 100 mL

- 以上の成分を常法により無菌的に混和して注射剤を調製する。主薬成分であるC3酵素を、化合物1、2、3又は4に変えてもよい。また添加剤の配合比を変えることにより、主薬の成分量が1000mg、500mg、200mg、100mg／100mLである注射剤を調製することができる。

実施例4 点眼剤

C3酵素	5 mg
15 ホウ酸	700 mg
ホウ砂	適量 (pH 7.0)
塩化ナトリウム	500 mg
ヒドロキシメチルセルロース	0.5 g
エデト酸ナトリウム	0.05 mg
20 塩化ベンザルコニウム	0.005 mg
滅菌精製水	全量 100 mL

- 滅菌精製水80mLを約80℃まで加温し、ヒドロキシメチルセルロースを加えて攪拌し、液温を室温まで戻す。この液にC3酵素、塩化ナトリウム、ホウ酸、エデト酸ナトリウムおよび塩化ベンザルコニウムを加えて溶解する。ホウ砂を適量加えてpHを7に調整する。滅菌精製水を加えて100mLまでメスアップする。主薬成分であるC3酵素を、化合物1、2、3又は4に変えてもよい。また添加剤の配合比を変えることにより、主薬の濃度が1w/v%、

0.5 w/v %、0.3 w/v %、0.1 w/v %、0.05 w/v %、0.03 w/v %、0.01 w/v %、0.003 w/v %、0.001 w/v %
である点眼剤を調製することができる。

実施例5 点眼剤

5	C3酵素	10 mg
	D-マンニトール	4.5 g
	リン酸二水素ナトリウム	0.1 g
	水酸化ナトリウム	適量 (pH 7.0)
	滅菌精製水	全量 100 mL

- 10 滅菌精製水80 mLにC3酵素、D-マンニトール、リン酸二水素ナトリウムを加えて溶解する。水酸化ナトリウムを適量加えてpHを5.0に調整する。滅菌精製水を加えて100 mLまでメスアップする。調製した点眼剤をメンブランフィルターで滅菌ろ過後、デスポーザブル (ユニットドーズ) 容器に充填、密封する。主薬成分であるC3酵素を、化合物1、2、3又は4に変えて
- 15 もよい。また添加剤の配合比を変えてもよい。また添加剤の配合比を変えることにより、主薬の濃度が1 w/v %、0.5 w/v %、0.3 w/v %、0.1 w/v %、0.05 w/v %、0.03 w/v %、0.005 w/v %、0.003 w/v %、0.001 w/v %である点眼剤を調製することができる。

産業上の利用可能性

- 20 本発明のRh oタンパク阻害剤を含有する医薬は三叉神経細胞の神経突起形成促進作用を有することから、角膜神経の損傷などに伴う角膜知覚機能低下の改善および角膜知覚機能低下に伴うドライアイ症状の改善に有用である。具体的には、Rh oタンパク阻害剤を適用することにより、白内障手術後やLASIK手術後の角膜知覚の低下、神経麻痺性角膜症、角膜潰瘍、糖尿病性角膜症
- 25 などの角膜神経変性に伴う角膜知覚低下やドライアイ症状の改善効果が期待できる。

以上、本発明の具体的な態様のいくつかを詳細に説明したが、当業者であれば示された特定の態様には、本発明の教示と利点から実質的に逸脱しない範囲で様々な修正と変更をなすことは可能である。従って、そのような修正および変更も、すべて後記の特許請求の範囲で請求される本発明の精神と範囲内に含

5 まれるものである。

本出願は、日本で出願された特願2003-114819および特願2003-273177を基礎としており、それらの内容は本出願にすべて包含されるものである。

請求の範囲

1. R h o タンパク阻害剤を含有する角膜神経突起形成促進剤。
2. R h o タンパク阻害剤を含有する角膜神経軸索伸展促進剤。
3. R h o タンパク阻害剤を含有する角膜知覚回復剤。
- 5 4. R h o タンパク阻害剤を含有するドライアイ治療剤。
5. R h o タンパク阻害剤を含有する角膜神経突起形成促進用組成物。
6. R h o タンパク阻害剤を含有する角膜神経軸索伸展促進用組成物。
7. R h o タンパク阻害剤を含有する角膜知覚回復用組成物。
8. R h o タンパク阻害剤を含有するドライアイ治療用組成物。
- 10 9. 角膜神経突起形成促進用組成物を製造するための R h o タンパク阻害剤の使用。
10. 角膜神経軸索伸展促進用組成物を製造するための R h o タンパク阻害剤の使用。
11. 角膜知覚回復用組成物を製造するための R h o タンパク阻害剤の使用。
- 15 12. ドライアイ治療用組成物を製造するための R h o タンパク阻害剤の使用。
13. 角膜神経の神経突起形成促進が必要とされる対象に R h o タンパク阻害剤の有効量を投与することによる角膜神経の神経突起形成を促進する方法。
14. 角膜神経の軸索伸展促進が必要とされる対象に R h o タンパク阻害剤の有効量を投与することによる角膜神経の軸索伸展を促進する方法。
- 20 15. 角膜知覚の回復が必要とされる対象に R h o タンパク阻害剤の有効量を投与することによる角膜知覚を回復する方法。
16. ドライアイに罹患した対象に R h o タンパク阻害剤の有効量を投与することによるドライアイを治療する方法。

1/3

図 1

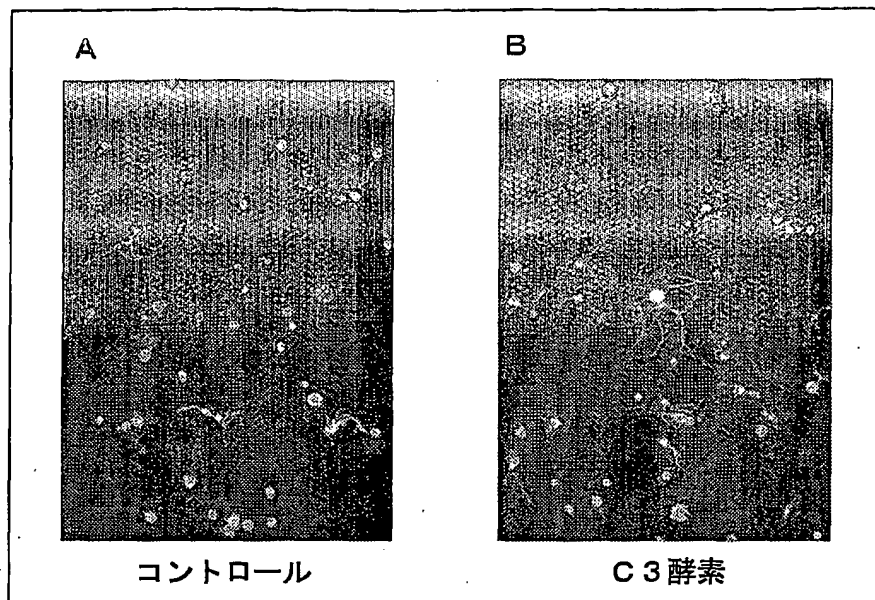
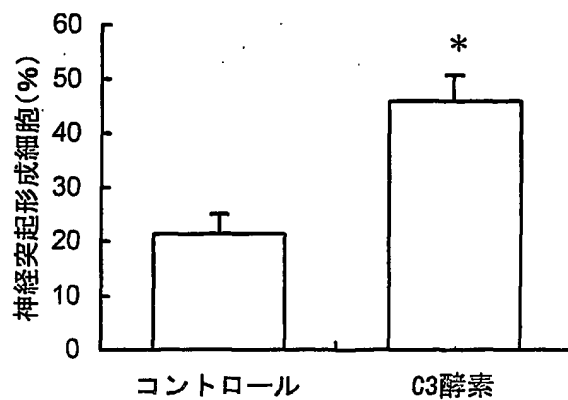


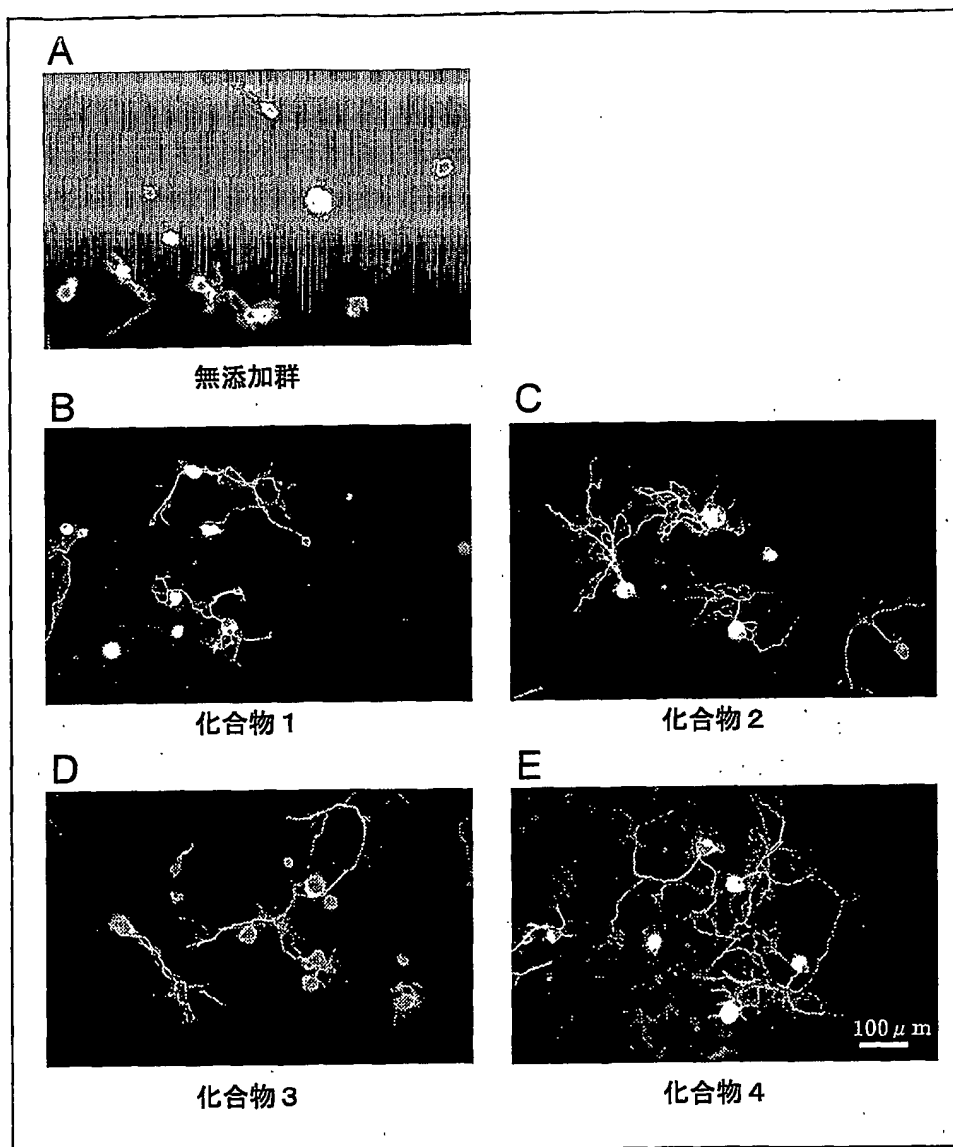
図 2



BEST AVAILABLE COPY

2/3

图 3



BEST AVAILABLE COPY

3/3

図 4

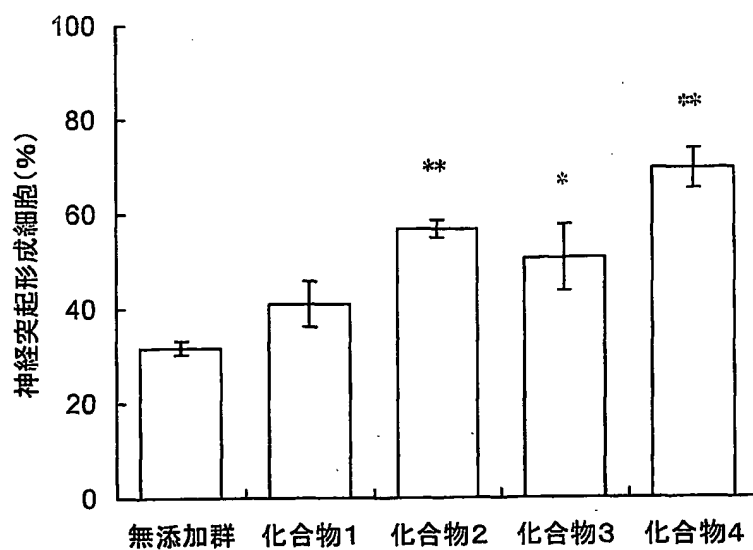
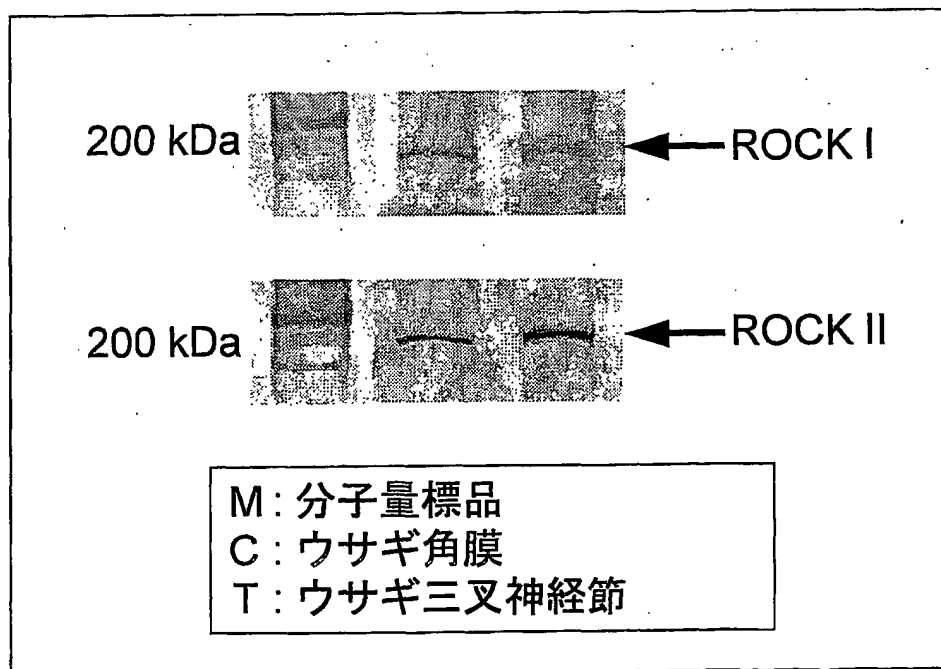


図 5



BEST AVAILABLE COPY

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005456

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K45/00, 38/00, 31/517, A61P27/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K45/00, 38/00, 31/517, A61P27/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE CAPLUS EMBASE BIOSIS (STN) JMEDPLUS (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NEGISHI M. et al., 'Regulation of neurite formation by Rho family GTPases.', Seikagaku. Journal of Japanese Biochemical Society, 2002 May; 74(5): 395-8. [Japanese]	1-12
X	Nikolic M. 'The role of Rho GTPases and associated kinases in regulating neurite outgrowth.' Int J. Biochem Cell Biol. 2002 July; 34(7): 731-45.	1-12
X	Lehmann M. et al., 'Inactivation of Rho signaling pathway promotes CNS axon regeneration.' J Neurosci. 01 September, 1999 (01.09.99); 19(17): 7537-47.	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
07 June, 2004 (07.06.04)

Date of mailing of the international search report
22 June, 2004 (22.06.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005456

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Dergham P. et al., 'Pho signaling pathway targeted to promote spinal cord repair.' J Neurosci. 01 August, 2002 (01.08.02): 22(15): 6570-7.	1-12
X	US 2002/0119140 A1 (Lisa McKerracher), 29 August, 2002 (29.08.02), Full text (Family: none)	1-12
X	WO 02/083175 A1 (Senju Pharmaceutical Co., Ltd.), 24 October, 2002 (24.10.02), Full text & EP 1378247 A1	1-12
X	WO 01/068607 A1 (Mitsubishi Pharma Corp.), 20 September, 2001 (20.09.01), Full text & EP 1270570 A1	1-12
X	JP 2003-073357 A (Mitsubishi Pharma Corp.), 12 March, 2003 (12.03.03), Full text (Family: none)	1-12
Y	WO 02/076977 A2 (BAYER CORP.), 23 October, 2002 (23.10.02), Example 1 (Family: none)	1-12
Y	WO 02/100833 A1 (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.), 19 December 2002 (19.12.02), Example 1 (Family: none)	1-12
Y	JP 2000-044513 A (Santen Pharmaceutical Co., Ltd.), 15 February, 2000 (15.02.00), Par. No. [0024]; compound 3 & EP 1094055 A1	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005456

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 13-16
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 13 to 16 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005456

<Subject of search>

Claims 1 to 12 relate to a corneal neurite formation promoter, a corneal nerveaxon extension promoter, a corneal perception repairing agent and a remedy for dry eye each containing, as the active ingredient, a compound defined by a desired property as "an Rho protein inhibitor". Thus, claims 1 to 12 involve any compounds having this property in the scopes thereof. However, it is recognized that only small part of the claimed compounds are exclusively disclosed in the description in the meaning within PCT Article 5 and thus these claims are not supported by the disclosure in the description in the meaning within PCT Article 6.

Even though the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, it cannot be recognized that the scope of compounds having the above property as "an Rho protein inhibitor" could be specified. Thus, claims 1 to 12 do not comply with the requirement of clearness as defined in PCT Article 6 too.

Therefore, the search was made on relationships among the inhibition of Rho protein and promotion of corneal neurite formation, promotion of corneal nerveaxon extension, repair of corneal perception and treatment for dry eye, as well as corneal neurite formation promoters, corneal nerveaxon extension promoters, corneal perception repairing agents and remedies for dry eye containing, as the active ingredient, the C3 enzyme and ROCK inhibitors of compounds 1 to 4 which are specifically illustrated in the description.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K45/00, 38/00, 31/517, A61P27/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K45/00, 38/00, 31/517, A61P27/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE CAPLUS EMBASE BIOSIS (STN) JMEDPLUS (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Negishi M et al. 'Regulation of neurite formation by Rho family GTPases.', Seikagaku. Journal of Japanese Biochemical Society, 2002 May; 74(5): 395-8. [Japanese]	1-12
X	Nikolic M. 'The role of Rho GTPases and associated kinases in regulating neurite outgrowth.' Int J Biochem Cell Biol. 2002 Jul; 34(7): 731-45.	1-12
X	Lehmann M et al. 'Inactivation of Rho signaling pathway promotes CNS axon regeneration.' J Neurosci. 1999 Sep 1; 19(17): 7537-47.	1-12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.06.2004

国際調査報告の発送日

22.6.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

川口 裕美子

4C

9829

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Dergham P et al. 'Rho signaling pathway targeted to promote spinal cord repair.' J Neurosci. 2002 Aug 1; 22(15): 6570-7.	1-12
X	US 2002/0119140 A1 (Lisa McKerracher) 2002. 08. 29, 全文, (ファミリーなし)	1-12
X	WO 02/083175 A1 (千寿製薬株式会社) 2002. 10. 24, 全文, & EP 1378247 A1	1-12
X	WO 01/068607 A1 (三菱ウェルファーマ株式会社) 2001. 09. 20, 全文, & EP 1270570 A1	1-12
X	JP 2003-073357 A (三菱ウェルファーマ株式会社) 2003. 03. 12, 全文, (ファミリーなし)	1-12
Y	WO 02/076977 A2 (BAYER CORPORATION) 2002. 10. 23, Example 1, (ファミリーなし)	1-12
Y	WO 02/100833 A1 (住友製薬株式会社) 2002. 12. 19, 実施例1, (ファミリーなし)	1-12
Y	JP 2000-044513 A (参天製薬株式会社) 2000. 02. 15, 【0024】 【化3】, & EP 1094055 A1	1-12

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 13-16 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲13-16は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

<調査の対象について>

請求の範囲1-12は、「Rhoタンパク阻害剤」という所望の性質により定義された化合物を有効成分とする角膜神経突起形成促進剤、角膜神経軸索伸展促進剤、角膜知覚回復剤、ドライアイ治療剤に関するものである。そして、請求の範囲1-12は、そのような性質を有するあらゆる化合物を包含するものであるが、PCT第5条の意味において開示されているのは、クレームされた化合物のごくわずかな部分にすぎず、PCT第6条の意味での明細書の開示による裏付けを欠くものと認められる。

また、「Rhoタンパク阻害剤」は、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する化合物の範囲を特定できないから、請求の範囲1-12は、PCT第6条における明確性の要件も欠いている。

よって、調査は、Rhoタンパクの阻害と角膜神経突起形成促進、角膜神経軸索伸展促進、角膜知覚回復、ドライアイ治療との関係について、及び、明細書に具体的に記載されたC3酵素及び化合物1-4のROCK阻害剤を有効成分とする角膜神経突起形成促進剤、角膜神経軸索伸展促進剤、角膜知覚回復剤、ドライアイ治療剤について行った。